

論文内容の要旨

論文題目 PPAR γ ligandによるcolon cancer cell line
への細胞増殖抑制誘導時におけるgene expression変
化のcDNA microarrayを用いた解析

指導教官 小俣政男教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士過程

内科学専攻消化器内科

氏名 鈴木 淳

peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) は、nuclear hormone receptor superfamilyに属し、ligand結合により転写因子として作用する。PPARには α , δ , γ の3種のisoformがあり、それぞれretinod X receptor (RXR)とheterodimerを形成、ligandと結合することによりDNA binding site (PPRE) に結合、下流遺伝子の転写を活性化する。PPAR γ はadipocyteに高発現し、脂質代謝酵素geneを誘導することが知られているが、colon mucosaでも比較的高発現を示しており、また、colon polyp, colon cancerにても高発現が認められる。PPAR γ の内因性のligandとしては、15-Deoxy-12,14-prostaglandin J2が存在する。PPAR γ の外因性のligandとしてはfibrate, thiazolinidedione (Troglitazone, BRL49653 (=Rosiglitazone), Pioglitazone) 等が存在する。thiazolinidedioneにはinslin感受性を高める作用があり、2型糖尿病に臨床応用されている。

これまでに、colon cancerを始め、PPAR γ ligandの種々のcancer cellに対する細胞増殖抑制効果の報告があるが、そのpathwayについては明らかではない。今回PPAR γ の特異的ligandであるBRL49653によるcolon cancer cellであるHCT116への細胞増殖抑制誘導時におけるgene expressionの経時的変化をcDNA microarrayを用いて解析を行った。

colon cancer各種cell lineにおいてNorthern blottingにてPPAR γ gene expressionが、また、Western blottingにてPPAR γ proteinの存在が確認された。colon cancer cell lineであるHCT116にBRL49653を20 μ M投与し、cell countにて24hourからの増殖抑制効果が確認され、fluorescence activated cell sorting assayにより12hourよりG1 arrestが確認された。また、luciferase reporter assayにてBRL49653によりPPAR γ がactivateされていることが確認された。

BRL49653 20 μ MをHCT116に加え、1hour, 3hour, 6hour, 12hour, 24hourでtotal RNAを抽出、これをCy5でlabelし、time 0で抽出したtotal RNAはCy3でlabelし、これをcontrolとし、microarrayへのhybridizationを行った。解析の結果、時間経過とともにCy5/Cy3の比(fold induction)が2以上または1/2以下のものが増加することが確認され、24hourにてfold inductionが2以上のgeneは32個、0.5以下のものは75個存在した。12hourにてG1 arrestが確認されていることから、少なくとも12hourからのexpressionの持続的変化が細胞増殖抑制に影響を与えるものと考え、12hourおよび24hourでfold inductionが2以上または0.5以下のものをlist upし、fold inductionが2以上のものは18gene、fold inductionが0.5以下のものは6gene存在した。fold inductionが2以上のgeneのうち細胞増殖抑制作用のあるものは5gene (early growth response 1, immediate early response 3, prostate differentiation facror, B-cell translocation gene 1, cyclin G2) 存在し、これらのうち4geneは6hourよりexpressionの上昇が認められた。

cDNA microarrayのdataを検証するために、同じtotal RNAを使用して上記5geneにつきRT-PCRを施行、結果はmicroarrayのdataと一致した。また、dose dependentにexpressionの増加が確認された。

RB patyway cell cycle component geneについてはcDNA microarrayにおけるsignal intensityがthreshold以下のものが多かったため、expressionの変化を確認するため、各geneに対しRT-PCRを施行、E2F1, E2F2, E2F3, DP1で12hourよりgene expressionの低下がみられ、24hourではほぼ消失しており、このことが直接細胞増殖抑制およびG1 arrestに影響を与えているものと考えられた。

今回PPAR γ の特異的ligandであるBRL49653によるcolon cancer cell lineへの細胞増殖抑制誘導時のgene expressionの変化をcDNA microarrayを用いて解析した。細胞増殖抑制に先行して細胞増殖抑制作用のあるearly growth response 1, immediate early response 3, prostate differentiation facror, B-cell translocation gene 1, cyclin G2のexpressionの持続的上昇が認められた。また、RT-PCRによりE2F1, E2F2, E2F3, DP1などcell cycle component geneのexpressionの低下が上記geneのexpressionの上昇に遅れて認められたが、このことが直接細胞増殖抑制に関係していると考えられた。

これらのことより、PPAR γ ligandによりtranscriptionの誘導されたanti-proliferative geneがcell cycle component geneのtranscription抑制に影響を与えている可能性が示唆された。